

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|   |  |  |
|---|--|--|
| (51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :<br><b>C07H 19/10, 19/20, C07F 9/6561</b><br><b>A61K 31/70</b>   | <b>A1</b>  | (11) Numéro de publication internationale: <b>WO 93/24510</b><br>(43) Date de publication internationale: 9 décembre 1993 (09.12.93) |
| (21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/00498<br>(22) Date de dépôt international: 24 mai 1993 (24.05.93)<br>(30) Données relatives à la priorité:<br>92/06383      25 mai 1992 (25.05.92)      FR<br>93/04117      7 avril 1993 (07.04.93)      FR<br>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) [FR/FR]; 15, quai Anatole-France, F-75007 Paris (FR).<br>(72) Inventeurs; et<br>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement) : GOSSELIN, Gilles [FR/FR]; Résidence "Parc-des-Arceaux", Bât. F1, Rue Paul-Rimbaud, F-34000 Montpellier (FR). IMBACH, Jean-Louis [FR/FR]; Laboratoire de Chimie Bio Organique USTL, Place Eugène Bataillon, F-34095 Montpellier (FR).   | (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).<br>(81) Etats désignés: CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br>Publiée<br>Avec rapport de recherche internationale. |  |
| (54) Title: PHOSPHOTRIESTER-TYPE BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS<br>(54) Titre: COMPOSES BIOLOGIQUEMENT ACTIFS DE TYPE PHOSPHOTRIESTERS<br><div style="text-align: center; margin: 20px 0;"> <math display="block">\text{RO} - \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{P} \\   \\ \text{OR} \end{array} - \text{Nu} \quad (I)</math> </div> <div style="text-align: center; margin: 20px 0;"> <math display="block">\begin{array}{c} \text{Z} \\ \parallel \\ -\text{C} - \text{Y} \end{array} \quad (a)</math> </div> <p>(57) Abstract</p> <p>Phosphotriester compound of general formula (I); wherein R is a radical - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - S - X in which X is a radical (a) or -S-U, Z being O or S, and Y and U denote an alkyl, aryl or osidic radical, optionally substituted in particular by an OH, SH or NH<sub>2</sub> group, and n is from 1 to 4, preferably 1 or 2, and Nu is a radical consisting of a biologically active compound residue or the dephosphorylated residue of a compound that is biologically active when it carries a phosphate or phosphonate group.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention a pour objet un composé phosphotriester répondant à la formule générale (I) dans laquelle: R est un radical - (CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub> - S - X où X représente un radical (a) ou -S-U, Z étant O ou S et, Y et U représentant un radical alkyle, aryle ou osidique, éventuellement substitué notamment par un groupe OH, SH ou NH<sub>2</sub> et, n est égal à 1 à 4 de préférence 1 ou 2 et, Nu est un radical consistant en un reste d'un composé biologiquement actif ou le reste déphosphorylé d'un composé qui est biologiquement actif lorsqu'il porte un groupe phosphate ou phosphonate.</p> |  |  |

# **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|--|----|-----------------------|
| AT | Autriche                  | FR | France                                     | MR | Mauritanie            |
| AU | Australie                 | GA | Gabon                                      | MW | Malawi                |
| BB | Barbade                   | GB | Royaume-Uni                                | NL | Pays-Bas              |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée                                     | NO | Norvège               |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce                                      | NZ | Nouvelle-Zélande      |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                    | PL | Pologne               |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                    | PT | Portugal              |
| BR | Brésil                    | IT | Italie                                     | RO | Roumanie              |
| CA | Canada                    | JP | Japon                                      | RU | Fédération de Russie  |
| CF | République Centrafricaine | KP | République populaire démocratique de Corée | SD | Soudan                |
| CG | Congo                     | KR | République de Corée                        | SE | Suède                 |
| CH | Suisse                    | KZ | Kazakhstan                                 | SK | République slovaque   |
| CI | Côte d'Ivoire             | LI | Liechtenstein                              | SN | Sénégal               |
| CM | Cameroon                  | LK | Sri Lanka                                  | SU | Union soviétique      |
| CS | Tchécoslovaquie           | LU | Luxembourg                                 | TD | Tchad                 |
| CZ | République tchèque        | MC | Monaco                                     | TG | Togo                  |
| DE | Allemagne                 | MG | Madagascar                                 | UA | Ukraine               |
| DK | Danemark                  | ML | Mali                                       | US | Etats-Unis d'Amérique |
| ES | Espagne                   | MN | Mongolie                                   | VN | Viet Nam              |
| FI | Finlande                  |    |  |    |                       |

COMPOSES BIOLOGIQUEMENT ACTIFS<sup>1</sup> DE TYPE PHOSPHOTRIESTERS

La présente invention concerne la fonctionnalisation bioréversible de groupes phosphates ou phosphonates de composés biologiquement actifs.

Plus particulièrement la présente invention concerne des composés biologiquement actifs du type phosphotriesters portant des groupes phosphates ou phosphonates protégés par des groupes protecteurs bioréversibles en milieu intracellulaire.

Les composés portant un groupe phosphate ou phosphonate ont une nature ionique chargée négativement et un pH physiologique. L'activité thérapeutique de tels composés est limitée de ce fait par la faible diffusion à travers les membranes biologiques lipidiques de composés négativement chargés. D'autre part, les composés portant des groupes phosphates sont sujets à une déphosphorylation aisée par l'action des enzymes phosphatases dans le sang ou sur les membranes cellulaires qui déphosphorylent les composés substrats. En général, les composés phosphates ou phosphonates chargés sont mal absorbés par administration orale et ne diffusent pas efficacement à travers les membranes cellulaires ou même la barrière cérébrale de nature lipidique.

Certains composés tels que les dérivés ou analogues de nucléosides sont actifs administrés sous forme non phosphorylée, mais sont phosphorylés in vivo sous forme de métabolique monophosphate ou triphosphate pour être actifs.

Ainsi les dérivés de nucléosides à activité antitumorale, tels que la 5-fluoro-uridine, la 5-fluoro-2'-désoxyuridine ou la 1-β-D-arabinofuranosylcytosine exercent leur activité sous forme phosphorylée.

De même, pour exercer leur activité antiproliférative, certains analogues de nucléosides ou de phosphononuécléosides se doivent d'être phosphorylés par des enzymes cellulaires -ou virales- en leur triphosphate correspondant ; celui-ci étant ensuite susceptible d'inhiber les polymérases virales et/ou cellulaires.

Parmi les différentes classes structurales d'agents antiviraux, les 2',3' -didésoxynucléosides sont des composés qui présentent une des meilleure efficacité lors du traitement du SIDA. Mais ces analogues de nucléoside doivent subir une biotransformation par des kinases cellulaires

pour exercer leur activité sur la réplication du VIH, l'agent étiologique du SIDA. Cette métabolisation se fait par passage par le didéoxynucléoside 5'-monophosphate puis le 5'-diphosphate pour conduire au 5'-triphosphate qui est un inhibiteur de la transcriptase inverse du VIH et qui interfère ainsi avec la biosynthèse de l'ADN viral.

Malgré leur grande potentialité thérapeutique, les 2',3'-didéoxynucléosides souffrent de limitations notamment la faible capacité de certains d'entre eux à être métabolisés par les kinases en triphosphate. La 2',3'-didésoxyuridine 5'-triphosphate par exemple, est un excellent inhibiteur de la transcriptase inverse (Z. Hao et coll., *Proc. Am., Assoc. Cancer Res.*, 1988, 29, 348, E.Matthes et coll., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1987, 148, 78-85). Par contre son nucléoside est inapte à inhiber la réplication du VIH in vitro. Des études ont montré que ce résultat est lié à la faible capacité du nucléoside à être métabolisé en son monophosphate par les kinases cellulaires (Z. Hao et coll. *Mol. Pharmacol.* 1990, 37, 157-153).

Ainsi, l'AZT est successivement métabolisée en son triphosphate (AZTP) qui est un puissant inhibiteur de la reverse transcriptase du VIH. De même, l'Acyclovir (ACV) est transformé en son triphosphate (ACVTP) qui inhibe sélectivement la DNA polymérase du virus de l'herpès. La première étape de l'activation des nucléosides (Nu) consiste en une monophosphorylation conduisant au monophosphate correspondant (NuMP). C'est cette première étape qui est la plus sélective.

Dans le but de passer outre cette étape clé de monophosphorylation enzymatique, on a déjà proposé d'administrer directement des NuMP, mais leur utilisation à des fins thérapeutiques s'est heurtée aux limitations et inconvénients mentionnés ci-après.

Les composés portant un groupe phosphate ou phosphonate ont une nature ionique chargée négativement à un pH physiologique. L'activité thérapeutique de tels composés est de ce fait limitée compte-tenu de la faible diffusion à travers les membranes biologiques lipidiques de composés négativement chargés. En particulier les composés chargés ne diffusent pas efficacement à travers les membranes cellulaires ni même à

travers la barrière cérébrale de nature lipidique. D'autre part de tels composés sont sujets à une déphosphorylation aisée par l'action des enzymes phosphatases dans le sang ou sur les membranes cellulaires qui déphosphorylent les composés substrats de ces enzymes. En général les composés phosphates ou phosphonates chargés sont mal absorbés par administration orale.

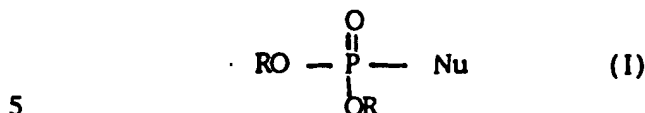
On a cherché à transformer des mononucléotides en des phosphotriesters neutres susceptibles de traverser la membrane cellulaire et de délivrer intracellulairement le phosphotriester mononucléotidique (NuMP) correspondant. Un tel concept a été abordé par divers auteurs depuis de nombreuses années, mais s'est avéré décevant. Les dérivés obtenus présentaient en général soit une toxicité trop importante soit une stabilité extracellulaire insuffisante et n'apportaient finalement aucune amélioration au plan de l'activité biologique.

Ainsi l'utilisation de structures nucléosidiques phosphorylées comprenant des groupements protecteurs bioréversibles de type acyloxyméthyle ou acyloxybenzyle a été proposée pour des dérivés nucléosides anti-tumoraux tels ceux de la 5-fluorouracile dans les brevets WO n° 9008155 et WO 9119721. Toutefois ces composés ont une stabilité chimique limitée, et génèrent in vivo des métabolites formaldéhydes toxiques. Ils sont en outre peu solubles et leur rendement de préparation chimique est faible.

Le but de la présente invention est donc de fournir d'autres types de groupements bioréversibles pouvant être associés notamment à des structures mononucléotidiques ou autres de sorte que leur activité biologique s'en trouve augmentée, en particulier en ce qui concerne les composés dérivés ou analogues de nucléosides à activité anti-virale, et ne présentant pas les inconvénients précités.

La présente invention propose d'utiliser de nouveaux groupements caractérisés par la présence de liaisons enzymo-labiles  $-S\text{---}S-$  et/ou  $-S\text{---}C=Z$  qui conduisent après activation enzymatique à la formation d'intermédiaires instables libérant sélectivement le monophosphate ou monophosphonate correspondant.

La présente invention a plus précisément pour objet le composé répondant à la formule générale I :



dans laquelle :

- R est un radical  $-(\text{CH}_2)_n\text{-S-X}$

où : - X représente un radical  $\begin{array}{c} \text{-C-Y ou -S-U,} \\ || \\ \text{Z} \end{array}$

- Z étant O ou S,

- Y et U représentant un radical alkyle, aryle ou osidique, éventuellement substitué notamment par un groupe OH, SH ou NH et,

- n est égal à 1 à 4 de préférence 1 ou 2 et,

- Nu est un radical consistant en un reste de composé biologiquement actif ou le reste déphosphorylé d'un composé qui est biologiquement actif lorsqu'il porte un groupe phosphate ou phosphonate.

Lorsque dans la formule (I) Nu est lié au phosphore par une liaison P-O, le composé de formule (I) selon l'invention porte un groupe phosphate et constitue donc un composé phosphotriester.

Lorsque Nu est lié au phosphore par une liaison P-C, le composé de formule (I) selon l'invention porte un groupe phosphonate.

Les mécanismes de bioréversibilité des radicaux R se font par une coupure enzymatique des liaisons S-X et une libération des restes  $(\text{CH}_2)_n\text{-S}$  selon un mécanisme illustré par les exemples représentés figure 1.

On cite en particulier pour Y et U comme groupement alkyle, un alkyle en  $\text{C}_1$  à  $\text{C}_7$  ; comme groupement aryle, les radicaux phényle et benzyle et, comme radicaux osidiques, le glucose, le mannose ou le rhamnose.

Dans un mode de réalisation, lorsque X représente SU de préférence U représente le radical  $-(\text{CH}_2)_{n^1} - \text{X}^1$  où  $\text{X}^1$  représente H, OH, SH, ou  $\text{NH}_2$  et  $n^1$  est égal à 1 à 4, de préférence 1 ou 2.

On cite en particulier les composés (I) dans lesquels R représente  $-(\text{CH}_2)_2\text{-S-S-(CH}_2)_2\text{-OH}$ .

Dans un autre mode de réalisation lorsque X représente  $\text{-C-Y}$ , de façon appropriée Y représente  $\text{CH}_3$  ou tBu.

On cite en particulier les composés (I) pour lesquels R représente  $\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-S-C-CH}_3$  ou  $\text{(CH}_2\text{)}_n\text{-S-C-tBu}$  avec  $n = 1$  ou  $2$ .

5

Dans un mode de réalisation avantageux de la présente invention des composés (I), on cite en particulier les composés pour lesquels Nu représente un reste en 5' de nucléoside naturel ou de dérivé de nucléoside naturel thérapeutiquement actif ou dont le dérivé 5'-(O)-monophosphate ou 5'-(C)-monophosphonate est thérapeutiquement actif.

10

Ces composés de formule (I) ont en général une activité anti-virale ou anti-tumorale.

15

On cite plus particulièrement les composés de formule (I) pour lesquels Nu représente un reste en 5' de 2',3'- didéoxynucléoside ou 2',3'- didéhydronucléoside.

20

Parmi les composés (I) dérivés de didéoxynucléosides à activité antivirale on cite plus particulièrement les composés (I) pour lesquels Nu est un reste en 5' de la ddU (didéoxyuridine), la ddT (didéoxythymidine), la ddC (didéoxycytidine), l'AZT (3'-azido, 2',3'-didéoxythymidine) ainsi que leurs dérivés substitués notamment sur la base pyrimidique ou en 2' et 3' du cycle osidique.

La ddT, la ddC ou l'AZT illustrent les radicaux Nu qui représentent un reste en 5' de dérivé de nucléoside naturel thérapeutiquement actif.

25

La ddU illustre les radicaux Nu qui représentent un reste en 5' d'un dérivé de nucléoside qui n'est actif que sous forme phosphorylée. La ddU (didéoxyuridine) n'est pas monophosphorylée enzymatiquement in vivo. Seul son triphosphate est un inhibiteur de polymérase et lui confère une activité anti-virale.

30

Parmi les composés (I) à activité anti-tumorale on cite en particulier les composés pour lesquels Nu représente un reste en 5' des dérivés 5-fluoro-uridine ou 5-fluoro-2'-désoxyuridine ou 1-β-D-arabinofuranosylcytosine. Ces composés illustrent l'intérêt de la fonctionnalisation selon l'invention pour contourner la résistance acquise à certaines drogues nucléosidiques lorsque cette résistance est due à une perte de leur aptitude à être monophosphorylé comme c'est souvent le cas en chimiothérapie anti-tumorale.

35



Selon une autre variante de réalisation de l'invention dans les composés (I) le radical Nu représente un reste d'analogue de nucléoside tel qu'un carbonucléoside (nucléoside dont l'oxygène du cycle osidique est remplacé par un carbone), un phosphononucléoside (nucléoside dont l'oxygène en 5' est remplacé par un carbone) ou un dérivé de base purine ou pyrimidine du type acyclonucléoside c'est à dire ne comportant pas de cycle osidique tel que l'ACV (aciclovir) ou un radical méthoxyalkyl-purine ou- pyrimidine de formule  $\text{CH}_2\text{-O-alkyl-purine ou- pyrimidine}$ .

Les composés (I) pour lesquels Nu représente un radical méthoxyalkyl-purine ou- pyrimidine illustrent les composés phosphonates. Il s'agit en l'espèce de composés anti-viraux phosphonyl-méthoxyalkyl-purine ou- pyrimidine parmi lesquels on cite en particulier le PMEPA, l'HPMPA ou l'HPMPC dont les formules sont données dans les figures 3 et 4.

La présente invention a donc en particulier pour objet des composés dans lesquels Nu est un radical 3-hydroxy-2-méthoxypropyl-purine ou-pyrimidine de formule :  $\text{-CH}_2\text{-O-CH(CH}_2\text{OH)-CH}_2\text{-}$  purine ou- pyrimidine ou un radical 2-méthoxyéthyl-purine ou- pyrimidine de formule  $\text{-CH}_2\text{-O-C}_2\text{H}_4\text{-}$  purine ou- pyrimidine et par exemple les composés (I) pour lesquels Nu est un radical méthoxy-éthyl adénine ou 3-hydroxy -2-méthoxypropyl cytosine.

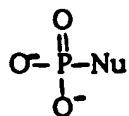
Lorsque Nu représente un reste déphosphorylé (déphosphaté ou déphosphonaté) d'une molécule qui est biologiquement active lorsqu'elle est sous forme phosphate ou phosphonate, la fonctionnalisation selon l'invention peut permettre d'une façon générale de moduler les paramètres physico-chimiques et biophysiques de ladite molécule comprenant un groupe phosphate ou phosphonate. Le composé (I) peut alors par exemple consister en un composé phosphopeptide ou phospholipide.

où Nu représente un reste de nucléoside, de dérivé ou d'analogue de nucléoside ceux ci peuvent être des énantiomères D ou L.

Les composés selon l'invention peuvent être préparés par des procédés connus de l'homme de l'art.

- 5 En particulier la présente invention a pour objet un procédé de préparation des composés selon l'invention caractérisé en ce que l'on prépare un composé de formule (I) dans lequel les groupes fonctionnels de R, et éventuellement de Nu, sont protégés par des groupes protecteurs appropriés puis l'on déprotège lesdits groupes fonctionnels de R, et  
10 éventuellement de Nu, pour obtenir les composés de formule (I).

En particulier de façon appropriée on fait réagir un composé de formule (II) :



- 15 où Nu est éventuellement protégé, avec le composé de formule (III) X-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH où X est protégé pour obtenir ledit composé de formule (I) protégé que l'on déprotège ensuite.

- 20 Dans un mode de réalisation particulier, la réaction entre les composés de formule (II) et (III) se fait en présence d'un agent de condensation tel que le MSNT dans de la pyridine.

D'autres procédés de préparation sont illustrés dans les exemples qui suivent dans lesquels apparaîtront également d'autres caractéristiques et avantages de la présente invention.

- 25 La description fait référence aux figures 1 à 6, dans lesquelles :
- La figure 1 représente des mécanismes de décomposition des groupements bioréversibles sous activation enzymatique. Le même mécanisme se produit pour les deux groupes R.
  - La figure 2 représente le mécanisme de décomposition du groupe bioréversible du composé de l'exemple 2.
  - La figure 3 représente la formule de certains composés selon l'invention.

- La figure 4 représente un schéma de préparation de composés préparés à l'exemple 1 et la formule des composés HPMPA et HPMP.
  - La figure 5 représente les schémas de préparation de composés préparés aux exemples 2 et 3.
- 5 - La figure 6 représente le schéma de préparation de composés préparés à l'exemple 4.

L'intérêt de cette invention résidant dans la différence de stabilité des phosphotriesters mononucléotidiques entre les milieux extra- et intra-cellulaires, il est tout d'abord montré que la décomposition de l'un des composés décrits dans l'invention (exemple 2) répond bien aux critères  
5 précédemment énoncés et s'effectue selon le mécanisme présenté figure 2.

La technique HPLC "ISRP on line" (*"On-line Internal Surface Reversed-Phase Cleaning : The Direct HPLC Analysis of Crude Biological Samples"*, A. POMPON, I. LEFEBVRE et J.L. IMBACH, *Biochemical Pharmacology*, 43, 1769-1775 (1992) ) a été utilisé pour cette étude, le  
10 composé étudié étant respectivement incubé dans le milieu de culture (RPMI / 10% sérum inactivé) et dans un extrait cellulaire total (CEM).

Le composé de l'exemple 2 présente un temps de demi-vie de 9 heures en milieu de culture et de moins de 5 minute en extrait cellulaire.  
15 La libération intracellulaire de NuMP correspondant est corroborée par la mise en évidence d'une activité biologique, alors que le nucléoside constitutif est inactif.

De plus, dans la mesure où l'étape déterminant la vitesse d'activation du phosphotriester en mononucléotide est hautement  
20 dépendante de la cinétique d'hydrolyse enzymatique initiale, une variation de la nature des groupements enzymo-labiles conduit à une modulation des paramètres pharmacocinétiques de la drogue et aboutit à des effets retard.

Ces données valident clairement l'intérêt de l'invention.

Les chromatographies sur couche mince ont été réalisées sur plaques de silice Merck 60F 254 (art.5554). Les chromatographies sur colonne de gel de silice ont été effectuées avec de la silice Merck 60 H (art. 7736) ou avec de la silice silanisée RP2 Merck (art. 7719).

- 5 Avant analyse ou lyophilisation, les solutions ont été filtrées sur filtre Millex HV-4 (Millipore).

Les spectres UV ont été enregistrés sur un spectrophotomètre UVIKON 810.

- 10 Les spectres de masse ont été pris sur un appareil JEOL JMS DX 300 par la méthode d'ionisation FAB en mode positif ou négatif dans une matrice de glycérol (G), glycérol/thioglycérol (GT) ou d'alcool 3-nitrobenzylique (NBA).

Les spectres RMN du proton ont été enregistrés sur un appareil Varian EM 360 ou sur appareil Brüker AC 250.

- 15 Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au signal du tétraméthylsilane (TMS).

La multiplicité et l'allure des signaux observés par RMN sont indiquées par une (ou plusieurs) lettre(s) : s (singulet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), l (large).

- 20 Les spectres RMN du phosphore ont été enregistrés sur un appareil Brüker WP 200 SY avec découplage du proton.

Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport au signal de  $H_3PO_4$  pris comme référence externe.

25

Exemple 1:

**O-(2',3'-didésoxyuridin-5'-yl) O,O'-bis(S-acétyl 2-thioéthyl)phosphate (1)**  
(Schéma en figure 4)

30

**2-Hydroxyéthyl acétyl sulfide (5)**

- 35 Une solution de 1,0 ml (14 mmol.) d'acide thioacétique dans 5 ml de toluène est traitée avec 0,90 ml (12 mmol.) d'iodoéthanol en présence de 1,7 ml (12 mmol.) de 1,8-diazabicyclo-(5,4,0) undéc-7-èn (DBU) pendant 2

heures. Le milieu réactionnel est dilué avec du dichlorométhane et lavé avec de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée. Le brut obtenu est purifié sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol (0-4%) dans le dichlorométhane) pour conduire à 1.2 g (85%) de **5** sous forme d'huile.

**5** : RMN<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) : δ = 2.32 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.91 (t, 2H, CH<sub>2</sub>S, J = 6.6 Hz); 3.45 (pseudo q, 2H, CH<sub>2</sub>OH, J = 6 Hz); 4.97 (t, 1H, OH) ppm.

#### 10 O-(2',3'-didésoxyuridin-5'-yl)-hydrogénophosphate (**6**)

Une solution 1.5 M d'acide phosphoreux (165 ml, 247 mmol.) dans la pyridine anhydre est ajoutée à 5.25 g de 2',3'-didésoxyuridine (24.7 mmol.) et est traitée avec 16.8 ml de chlorure de pivaloyle (136 mmol.).  
 15 Après 3 heures de réaction, une solution aqueuse 1 M de bicarbonate de triéthylammonium est ajoutée jusqu'à neutralisation et le solvant est évaporé sous pression réduite. L'huile obtenue est chromatographiée sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol (0-35%) dans le dichlorométhane) pour conduire à **6**. Le produit est repris dans du  
 20 méthanol et est filtré sur filtre Millipore. L'évaporation du solvant donne 7.10 g (76%) de **6** (forme triéthylammonium) suffisamment pur pour la suite de la synthèse. Un échantillon de plus grande pureté est obtenu après une purification supplémentaire par chromatographie sur couche mince de gel de silice utilisant un mélange d'isopropanol, ammoniac, eau (8:1:1) comme éluant. Le produit sous forme ammonium est extrait de  
 25 la silice avec du méthanol, le solvant est chassé par évaporation et le résidu est repris à l'eau, filtré sur filtre Millipore et lyophilisé.

**6**: UV (H<sub>2</sub>O) : λ<sub>max</sub> = 262 nm (ε 9940); λ<sub>min</sub> = 230 nm (ε 2080)

30 SM (FAB négatif, GT) : 275 (M)<sup>-</sup>

RMN<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) : δ = 1.78-2.05 (m, 3H, H-2',3',3'"); 2.18-2.45 (m, 1H, H-2'"); 3.65-3.95 (m, 2H, H-5',5'"); 4.11 (m, 1H, H-4'); 5.55 (d, 1H, H-5, J = 8.1 Hz); 5.95 (dd, 1H, H-1', J = 6.8 et 3.8 Hz); 6.63 (d, 1H, HP, J = 592 Hz); 7.87 (d, 1H, H-6, J = 8.1 Hz) ppm

35 RMN<sup>31</sup>P (DMSO-d<sub>6</sub>) : δ = 1.60 ppm.

**O-(2',3'-didésoxyuridin-5'-yl) O,O'-bis(S-acétyl 2-thioéthyl) phosphate (1)**

Une solution de 200 mg (0,530 mmol.) de l'hydrogénophosphonate **6** de la 2',3'-didésoxyuridine dans 5 ml de pyridine est traitée avec 196 µl de chlorure de pivaloyle pendant 30 minutes. 159 mg (1,33 mmol.) de 2-hydroxyéthyl acétyl sulfide (**5**) sont ajoutés et la réaction est laissée 2 heures sous agitation. Le phosphite formé est oxydé à l'aide d'une solution d'iode à 2% dans un mélange pyridine-eau (98:2) jusqu'à coloration persistante (7-8 ml). Le solvant est évaporé sous pression réduite. Le brut obtenu est coévaporé avec du toluène et chromatographié sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol (0-6%) dans le dichlorométhane) pour conduire à 65 mg (25%) du composé **1** sous forme d'huile.

**1**: UV (EtOH) :  $\lambda_{\text{max}}$  = 262 nm (e 9400);  $\lambda_{\text{min}}$  = 230 nm (e 2500)  
 SM (FAB positif) : 497 (M+H)<sup>+</sup>  
 RMN<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  = 1,73-2,13 (m, 3H, H-2',3',3"); 2,20-2,4 (m, 1H, H-2"); 2,356 et 2,360 (s et s, 3H et 3H, 2 CH<sub>3</sub>); 3,13 (t, 4H, 2 CH<sub>2</sub>S, J = 6,4 Hz); 4,00-4,26 (m, 7H, H-4', 5',5" et 2 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP); 5,60 (d, 1H, H-5, J = 8,1 Hz); 6,01 (dd, 1H, H-1', J = 4,2 et 7,0 Hz); 7,64 (d, 1H, H-6, J = 8,1 Hz); 11,3 (sl, 1H, NHCO) ppm.  
 RMN<sup>31</sup>P (DMSO-d<sub>6</sub>) :  $\delta$  = -1,21 ppm.

**Exemple 2:**

**O,O'-Bis (S-(2-hydroxyéthylsulfidyl) 2-thioéthyl) O-(2',3'-didésoxyuridin-5'-yl) phosphate (2).**  
 (Schéma en figure 5)

30

**O,O'-Bis (S-(O-(4-méthoxytrityl) 2-oxéthylsulfidyl) 2-thioéthyl) phosphate (8).**

35

A une solution de 0,910 g (13,4 mmoles) d'imidazole dans 18 ml de pyridine à 0°C sont ajoutés 0,406 ml (4,45 mmoles) d'oxychlorure de phosphore. Le mélange est agité 30 minutes à température ambiante puis

ajouté à 3.80 g (8.91 mmoles) de mono-O (4-méthoxytrityl) dithiodiéthanol (7). Après 18 heures, le mélange réactionnel est traité avec une solution 1 M d'acétate de triéthylammonium. Les produits de la réaction sont extraits avec du dichlorométhane et la phase organique est lavée avec de l'eau, séchée sur sulfate de sodium, concentrée sous pression réduite et coévaporée avec du toluène. Une purification sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol (0-10%) dans le dichlorométhane) conduit à 2.2 g (48%) de 8 sous forme de sel de triéthylammonium.

8 : SM (FAB négatif, NBA) : 913 ( $M^-$ ).  
 RMN<sup>1</sup>H (DMSO-*d*<sub>6</sub>) : 1.14 (t, 9H, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>, J = 7.3 Hz); 2.78 (t, 4H, 2 SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP, J = 6.4 Hz); 2.86 (t, 4H, 2 SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMTr, J = 6 Hz); 2.99 (q, 6H, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sup>+</sup>, J = 7.3 Hz); 3.21 (t, 4H, 2 CH<sub>2</sub>OMTr, J = 5.9 Hz); 3.71 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>O); 3.87 (m, 4H, 2 CH<sub>2</sub>OP); 6.82-7.45 (m, 28H, 2 Tr) ppm.  
 RMN<sup>31</sup>P (DMSO-*d*<sub>6</sub>) : - 2.70 ppm.

O,O'-Bis (S-(2-hydroxyéthylsulfidyl) 2-thioéthyl) O-(2',3'-didésoxyuridin-5'-yl) phosphate (2).

Un mélange de 666 mg (0.655 mmoles) de 8 et de 139 mg (0.656 mmoles) de 2',3'-didésoxyuridine dans 5 ml de pyridine est traité avec 486 mg (1.64 mmoles) de 1-(2-mésitylènesulfonyl) 3-nitro 1,2,4-triazole. Après 30 heures, le mélange réactionnel est dilué avec du dichlorométhane, lavé avec une solution aqueuse 1M d'acétate de triéthylammonium, puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, concentrée sous pression réduite, coévaporée avec du toluène et chromatographiée sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol (0-4%) dans le dichlorométhane). Le phosphotriester protégé partiellement purifié est traité avec 5 ml du mélange acide acétique/eau/méthanol (8:1:1) pendant 24 heures. Les solvants sont chassés par évaporation sous pression réduite et l'huile obtenue est coévaporée avec du toluène. Une purification sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol (0-6%) dans le dichlorométhane) suivie d'une purification sur colonne de silice silanisée (éluant : éthanol (0-40%) dans l'eau) conduit à 52 mg (14%) du composé 2 après lyophilisation dans le dioxanne.

2 : UV (EtOH) :  $\lambda$  max 261 nm ( $\epsilon$  9900)

$\lambda$  min 231 nm ( $\epsilon$  3100).

SM (FAB positif, GT) : 565 (M+H)<sup>+</sup>; 489 (M-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH+2H)<sup>+</sup>; 429 (M-  
5 HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>+2H)<sup>+</sup>.

RMN<sup>1</sup>H (DMSO-*d*6) : 1.63-1.9 (m, 1H, H-3'); 1.9-2.10 (m, 2H, H-2'.3');  
2.33-2.40 (m, 1H, H-2''); 2.80 (t, 2H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S, J = 6.4 Hz); 2.81 (t, 2H,  
HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S, J = 6.4 Hz); 3.00 (t, 4H, 2 SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP, J = 6.3 Hz); 3.61  
(pseudo q, 4H, 2 HOCH<sub>2</sub>, J = 6 Hz); 4.07-4.32 (m, 7H, H-4'.5'.5'' et 2  
10 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP); 4.89 (t, 2H, 2 HO, J = 4.9 Hz); 5.598 (d, 1H, H-5, J = 8.1 Hz);  
5.604 (d, 1H, H-5, J = 8.1 Hz); 6.00 (dd, 2H, 2 H-1', J = 4.1 et 7.9 Hz); 7.65  
(d, 2H, 2 H-6, J = 8.0 Hz); 11.31 (sl, 1 H, NHCO) ppm.

RMN<sup>31</sup>P (DMSO-*d*6) : - 0.880 ppm.

15

### Exemple 3:

O,O'-Bi- (S-(2-hydroxyéthylsulfidyl) 2-thioéthyl) O-(3'-azido 3'-désoxy-  
thymidin-5'-yl) phosphate (3).

20 (Schéma en figure 5)

Un mélange de 666 mg (0.655 mmoles) de 8 et de 193 mg (0.722  
mmoles) de 3'-azido 3'-désoxythymidine dans 5 ml de pyridine est traité  
25 avec 486 mg ( 1.64 mmoles) de 1-(2-mésitylènesulfonyl) 3-nitro 1.2.4-  
triazole. Après 24 heures, 194 mg (0.656 mmoles) de 1-(2-  
mésitylènesulfonyl) 3-nitro 1.2.4 triazole sont rajoutés et la réaction est  
laissée 24 heures supplémentaires. Le mélange réactionnel est alors dilué  
avec du dichlorométhane, lavé avec une solution aqueuse 1M d'acétate de  
30 triéthylammonium, puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur  
sulfate de sodium, concentrée sous pression réduite, coévaporée avec du  
toluène et chromatographiée sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol  
(0-2%) dans le dichlorométhane). Le phosphotriester protégé partiellement  
purifié est traité avec 5 ml du mélange acide acétique/eau/méthanol  
35 (8:1:1) pendant 24 heures. Les solvants sont chassés par évaporation sous  
pression réduite et l'huile obtenue est coévaporée avec du toluène. Une  
purification sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol (0-6%) dans le



dichlorométhane) conduit à 130 mg (29%) du composé 3 après lyophilisation dans le dioxanne.

3 : UV (EtOH) :  $\lambda$  max 264 nm ( $\epsilon$  9600)

5  $\lambda$  min 234 nm ( $\epsilon$  2100).

SM (FAB positif, GT) : 620 (M+H)<sup>+</sup>; 544 (M-SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH+2H)<sup>+</sup>.

RMN<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) : 1.80 (s, 3H, CH<sub>3</sub>); 2.26-2.5 (m, 2H, H-2',2''); 2.796 (t, 2H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S, J = 6.4 Hz); 2.802 (t, 2H, HOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>S, J = 6.4 Hz); 2.99 (t, 4H, 2 SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP, J = 6.3 Hz); 3.61 (pseudo q, 4H, 2 HOCH<sub>2</sub>, J = 6 Hz); 4.02 (m, 1H, H-4'); 4.09-4.44 (m, 6H, H-5',5'' et 2 CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP); 4.48 (m, 1H, H-3'); 4.90 (t, 2H, 2 HO, J = 5.3 Hz); 6.14 (t, 1H, H-1', J = 6.6 Hz); 7.49 (s, 1H, H-6); 11.37 (sl, 1H, NHCO) ppm.

RMN<sup>31</sup>P (DMSO-d<sub>6</sub>) : - 0.954 ppm.

15

Exemple 4:

**9-(2-(O,O'-Bis(S-(2-hydroxyéthylsulfidyl)-2-thioéthyl)phosphonylméthoxy-éthyl)adénine (4).**

20 (Schéma en figure 5)

**N<sup>6</sup>-(4-Méthoxytrityl)9-(2-diéthoxyphosphonylméthoxyéthyl)adénine (10).**

25 Une solution de 3.93 g (11.9 mmoles) de 9-(diéthoxyphosphonylméthoxyéthyl) adénine (9) (A. Holy et coll., *Collection Czechoslovak Chem. Commun.* 52, 2792, 1987) et de 146 mg (1.19 mmoles) de 4-diméthylaminopyridine dans 50 ml de dichlorométhane est traitée avec 3.31 ml (23.8 mmoles) de triéthylamine et 7.35 g (23.8 mmoles) de chlorure de 4-méthoxytrityle pendant 4 heures. Le mélange réactionnel est ensuite dilué avec du dichlorométhane et lavé avec une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de sodium puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium et concentrée sous pression réduite. Une chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol (0-3%) dans dichlorométhane) permet d'isoler 5.43 g (84%) du composé 10.

35

**10** : UV (EtOH) :  $\lambda$  max 275 nm ( $\epsilon$  27200)

$\lambda$  min 246 nm ( $\epsilon$  11200).

SM (FAB négatif, GT) : 601 (M-H)<sup>-</sup>; 406 (AMTr)<sup>-</sup>; 328 (M-MTr)<sup>-</sup>

RMN<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) : 1.10 (t, 6H, 2 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>, J = 7.0 Hz); 3.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O), 3.80-3.98 (m, 4H, PCH<sub>2</sub> et CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 3.88 (q, 4H, 2 CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>, J = 8 Hz); 4.33 (t, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, J = 4.8 Hz); 6.80-7.37 (m, 14H, Tr); 7.91 (s, 1H, H-8); 8.18 (s, H-2) ppm.

RMN<sup>31</sup>P (DMSO-d<sub>6</sub>) : 21.35 ppm.

10

**N<sup>6</sup>-(4-Méthoxytrityl) 9-(2-phosphonylméthoxyéthyl) adénine (11).**

Une solution de 5.00 g (8.31 mmoles) de **10** dans 29 ml d'acétonitrile est traitée avec 3.29 ml (24.9 mmoles) de bromure de triméthylsilyle pendant 14 heures. L'excès de réactif et le solvant sont chassés par évaporation sous pression réduite. L'huile obtenue est reprise avec du bicarbonate de triéthylammonium et concentré sous pression réduite. La purification est réalisée par chromatographie sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol (0-50%) dans le dichlorométhane). Après filtration en solution dans du dichlorométhane, 3.4 g (63%) de **11** sont isolés sous forme de sel mixte d'acide et de triéthylammonium (1:1).

**11** : SM (FAB négatif, GT) : 544 (M-H)<sup>-</sup>; 272 (M-MTr)<sup>-</sup>.  
RMN<sup>1</sup>H (DMSO-d<sub>6</sub>) : 1.11 (t, 9H, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)NH<sup>+</sup>, J = 7.3 Hz); 2.96 (q, 6H, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)NH<sup>+</sup>, J = 7.3 Hz); 3.34 (d, 2H, PCH<sub>2</sub>, J = 8.4 Hz); 3.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O); 3.8 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 4.27 (t, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, J = 4.5 Hz); 6.65-7.35 (m, 14H, Tr); 7.83 (s, 1H, H-8); 8.31 (s, 1H, H-2) ppm.

RMN<sup>31</sup>P (DMSO-d<sub>6</sub>) : 11.40 ppm.

30

**N<sup>6</sup>-(4-Méthoxytrityl)9-(2-(O,O'-Bis(S-(O-(4-méthoxytrityl)2-oxéthyl-sufidyl) 2-thioéthyl)) phosphonylméthoxyéthyl) adénine (12).**

Un mélange de 296 mg (0.458 mmoles) de **11** avec 977 mg (2.29 mmoles) de mono-O (4-méthoxytrityl) dithiodiéthanol (**7**) dans 5 ml de pyridine est traité avec 341 mg (1.15 mmoles) de 1-(2-mésitylènesulfonyl) 3-nitro 1,2,4 triazole. Après 3 jours, le mélange réactionnel est dilué avec

35

du dichlorométhane, lavé avec une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, puis avec de l'eau. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, concentrée sous pression réduite, coévaporée avec du toluène et chromatographiée sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol (0-5%) dans le dichlorométhane) pour donner 330 mg (53%) de 12.

12 : UV (EtOH) :  $\lambda$  max 275 nm ( $\epsilon$  28200)

$\lambda$  min 253 nm ( $\epsilon$  18300).

10 SM (FAB négatif, NBA) : 1360 (M-H)<sup>-</sup>; 952 (M-MTrOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SSCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sup>-</sup>.  
RMN<sup>1</sup>H (DMSO-*d*6) : 2.75 (t, 4H, 2 SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP, J = 6.3 Hz); 2.86 (t, 4H, 2 SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMTr, J = 5.9 Hz); 3.19 (t, 4H, 2 CH<sub>2</sub>OMTr, J = 6.0 Hz); 3.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>O); 3.69 (s, 6H, 2 CH<sub>3</sub>O); 3.83 (m, 4H, PCH<sub>2</sub> et CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>); 4.05 (m, 4H, 2 CH<sub>2</sub>OP); 4.28 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, J = 4.6 Hz); 6.87-7.45 (m, 42H, 3  
15 Tr); 7.88 (s, 1H, H-8); 8.12 (s, 1H, H-2) ppm.  
RMN<sup>31</sup>P (DMSO-*d*6) : 22.09 ppm.

9-(2-(O,O'-Bis(S-(2-hydroxyéthylsulfidyl)2-thioéthyl)phosphonylméthoxy-éthyl) adénine (4).

20

Le phosphotriester 12 (290 mg, 0.213 mmoles) est traité avec 15 ml du mélange acide acétique/eau/méthanol (8:1:1) pendant 15 heures. Les solvants sont chassés par évaporation sous pression réduite et l'huile obtenue est coévaporée avec du toluène. Une purification sur colonne de gel de silice (éluant : méthanol (0-8%) dans le dichlorométhane) conduit à  
25 116 mg (90%) du composé 4 après lyophilisation dans le mélange eau/dioxanne.

4 : UV (EtOH) :  $\lambda$  max 260 nm ( $\epsilon$  14700)

30

$\lambda$  min 228 nm ( $\epsilon$  3600).

SM (FAB positif, GT) : 545 (M+H)<sup>+</sup>.  
RMN<sup>1</sup>H (DMSO-*d*6) : 2.80 (t, 4H, 2 SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP, J = 6.4 Hz); 2.91 (t, 4H, 2 SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH, J = 6.4 Hz); 3.61 (pseudo q, 4H, 2 CH<sub>2</sub>OH, J = 6 Hz); 3.91 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, J = 5.1 Hz); 3.95 (d, 2H, PCH<sub>2</sub>, J = 8.2 Hz); 4.15 (m, 4H, 2  
35 CH<sub>2</sub>OP); 4.32 (t, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>, J = 5.0 Hz); 7.20 (sl, 2H, NH<sub>2</sub>); 8.08 (s, 1H, H-8); 8.14 (s, 1H, H-2) ppm.  
RMN<sup>31</sup>P (DMSO-*d*6) : 22.24 ppm.

**EXEMPLE 5 :****EVALUATION DE L'ACTIVITE ANTI-VIH 1 SUR LES CELLULES CEM ET MT-4**

- 5    **VIH**    = virus de l'immunodéficience humaine  
     **MT-4**   = cellule leucémique T humaine  
     **CEM**    = cellule lymphoblastoïde T humaine

10        La réplication du VIH-1 (isolat LAI) dans les cellules CEM est mesurée par un dosage de la réverse transcriptase (RTase) dans le surnageant de culture après 5 jours d'infection. Cette activité traduit la présence du virus libéré par les cellules. Après l'adsorption du virus, les composés testés sont ajoutés à différentes concentrations dans le milieu de culture.

15        L'activité antivirale est exprimée par la concentration la plus faible de composé qui diminue la production de RTase d'au moins 50% (ED<sub>50</sub>).

20        L'effet toxique sur les CEM non infectées est apprécié par une réaction colorimétrique basée sur la capacité des cellules vivantes à réduire le bromure de 3-(4,5 diméthylthiazol-2-yl)-2,5 diphényltétrazolium en formazan après 5 jours d'incubation en présence de différentes concentrations des composés. Les résultats sont exprimés par la concentration la plus faible de composé qui provoque une inhibition d'au moins 50% de la formation de formazan (CD<sub>50</sub>).

25        Les composés exemplifiés dans cette invention présentent les activités anti-HIV suivantes :

      . *Composé 1 :*

30        ED<sub>50</sub> - CEM-TK<sup>-</sup>, 4.10<sup>-6</sup> M (CD<sub>50</sub> 7.10<sup>-5</sup> M)  
             CEM-SS, 5.10<sup>-6</sup> M (CD<sub>50</sub> 9.10<sup>-5</sup> M)  
             MT4    , 2.10<sup>-6</sup> (CD<sub>50</sub> 9.10<sup>-5</sup> M)

      . *Composé 2 :*

      ED<sub>50</sub> - CEM-TK<sup>-</sup>, 8.10<sup>-6</sup> M (CD<sub>50</sub> 8.10<sup>-5</sup> M)  
             CEM-SS, 6.10<sup>-5</sup> M (CD<sub>50</sub> 10<sup>-4</sup> M)

. *Composé 3 :*

ED<sub>50</sub> - CEM-TK<sup>-</sup>,  $7.10^{-6}$  M (CD<sub>50</sub>  $8.10^{-5}$  M)

CEM-SS,  $7.10^{-10}$  M (CD<sub>50</sub>  $8.10^{-5}$  M)

MT4 .  $10^{-9}$  M (CD<sub>50</sub>  $8.10^{-5}$  M)

5

. *Composé 4 :*

ED<sub>50</sub> - CEM-TK<sup>-</sup>,  $8.10^{-8}$  M (CD<sub>50</sub> :  $4.10^{-5}$  M)

CEM-SS,  $3.10^{-6}$  M (CD<sub>50</sub> >  $10^{-4}$  M)

MT4 .  $8.10^{-7}$  M (CC<sub>50</sub> :  $2.10^{-5}$  M)

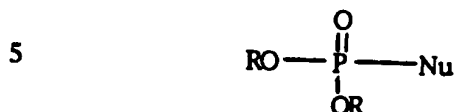
10

L'ensemble de ces données confirme bien qu'il y a eu libération intracellulaire du monophosphate nucléosidique.

15

**REVENDICATIONS**

1. Composé phosphotriester répondant à la formule générale I :



dans laquelle :

- R est un radical  $-(\text{CH}_2)_n\text{-S-X}$

10

où : - X représente un radical  $\begin{array}{c} \text{Z} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{Y} \text{ ou } -\text{S-U} \end{array}$ ,  
 - Z étant O ou S,  
 - Y et U représentant un radical alkyle, aryle ou osidique, éventuellement substitués notamment par un groupe OH, SH ou  $\text{NH}_2$  et,

15

- n est égal à 1 à 4 de préférence 1 ou 2 et,  
 - Nu est un radical consistant en un reste d'un composé biologiquement actif ou le reste déphosphorylé d'un composé qui est biologiquement actif lorsqu'il porte un groupe phosphate ou phosphonate.

20

2. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que X représente -S-U et, U représente le radical  $(\text{CH}_2)_{n^1}\text{-X}^1$  où  $\text{X}^1$  représente H, OH, SH ou  $\text{NH}_2$  et  $n^1$  est égal à 1 à 4 de préférence 1 ou 2.

25

3. Composé selon la revendication 2 caractérisé en ce que R représente  $-(\text{CH}_2)_2\text{-S-S-(CH}_2)_2\text{OH}$ .

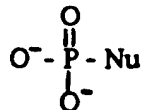
4. Composé selon la revendication 1 caractérisé en ce que X représente  $\begin{array}{c} \text{Z} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{Y} \end{array}$  et Y représente  $\text{CH}_3$  ou tBu.

30

5. Composé selon la revendication 4 caractérisé en ce que R représente  $-(\text{CH}_2)_n\text{-S-C(=O)-CH}_3$  ou  $-(\text{CH}_2)_n\text{-S-C(=O)-tBu}$  avec  $n=1$  ou 2.

6. Composé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que Nu représente un reste en 5' de nucléoside naturel, ou de dérivé de nucléoside naturel thérapeutiquement actif ou dont le dérivé 5'-(O) monophosphate ou 5'-(C) monophosphonate est thérapeutiquement actif.
- 5
7. Composé selon la revendication 6 caractérisé en ce que Nu représente un reste en 5' d'un dérivé de nucléoside naturel du type 2', 3'-didéoxynucléoside ou 2', 3'-didéhydronucléoside.
- 10
8. Composé selon la revendication 7 caractérisé en ce que Nu représente un reste en 5' de la ddU, ddT, ddC, de l'AZT, ou un dérivé de ces derniers substitué sur la base pyrimidique notamment en position 5 de celle-ci ou en 2' et 3' du cycle osidique.
- 15
9. Composé selon l'une des revendications 1 à 5 caractérisé en ce que Nu représente un reste d'analogue de nucléoside tel qu'un carbonucléoside, un phosphononucléoside ou un acyclonucléoside.
- 20
10. Composé selon la revendication 9 caractérisé en ce que Nu est un radical du type méthoxyalkyl-purine ou- pyrimidine de formule  $-\text{CH}_2-\text{O-alkyl}$  purine ou- pyrimidine.
- 25
11. Composé selon la revendication 10 caractérisé en ce que Nu est un radical 3-hydroxy-2-méthoxypropyl-purine ou pyrimidine de formule  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CH}_2-$  purine ou- pyrimidine ou, un radical 2-méthoxyéthyl-purine ou- pyrimidine de formule  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4-$  purine ou- pyrimidine.
- 30
12. Procédé de préparation d'un composé selon l'une des revendications 1 à 11 caractérisé en ce que l'on prépare un composé de formule (I) dans lequel les groupes fonctionnels de R, et éventuellement de Nu, sont protégés par des groupes protecteurs appropriés puis l'on déprotège lesdits groupes fonctionnels de R, et éventuellement de Nu, pour obtenir les composés de formule (I).

13. Procédé selon la revendication 12 caractérisé en ce que l'on fait réagir un composé de formule (II) :



5

où Nu est éventuellement protégé, avec le composé de formule (III) :

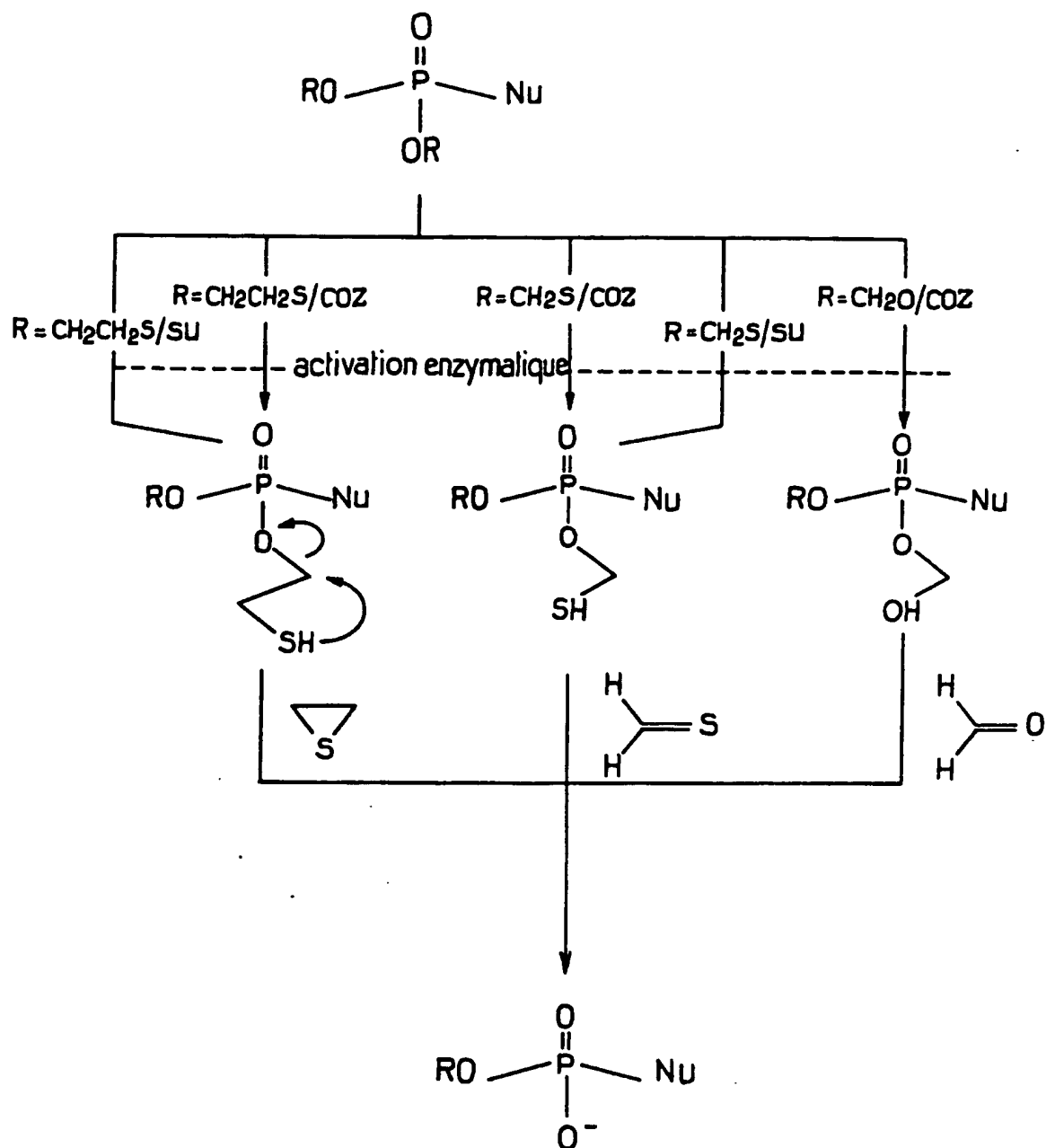
X-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH où X est protégé pour obtenir ledit composé de formule (I) protégé que l'on déprotège ensuite.

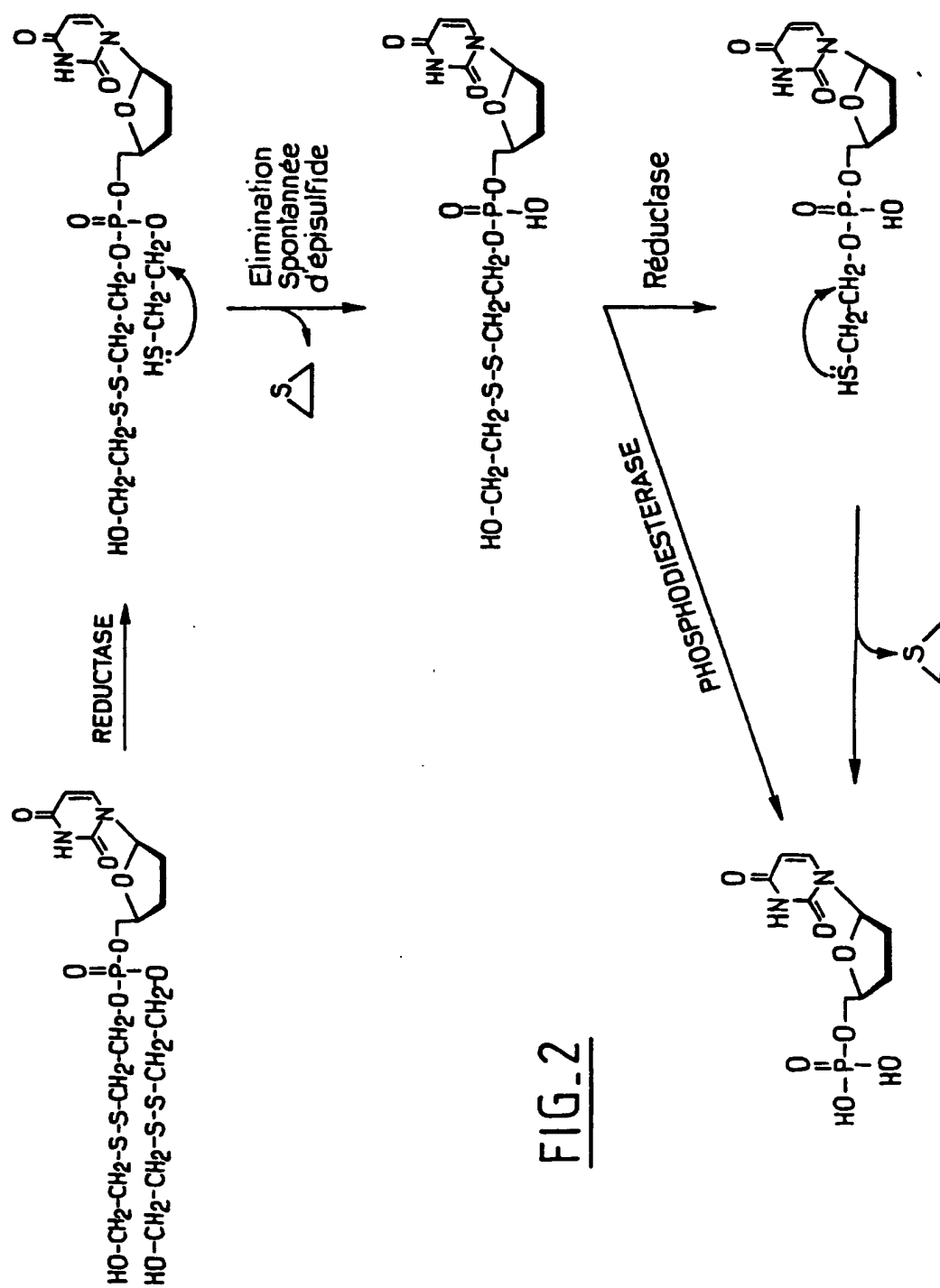
10

14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que la réaction entre les composés de formules (II) et (III) se fait en présence d'un agent de condensation tel que le MSNT dans de la pyridine.



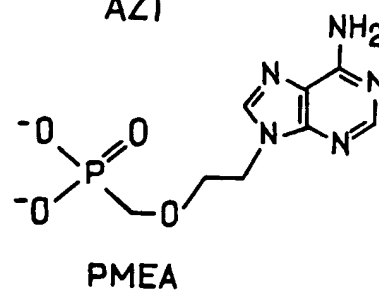
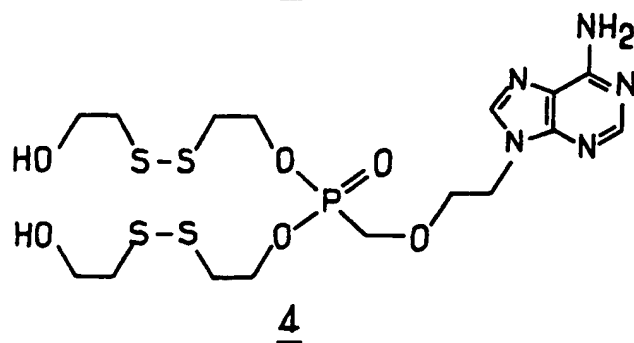
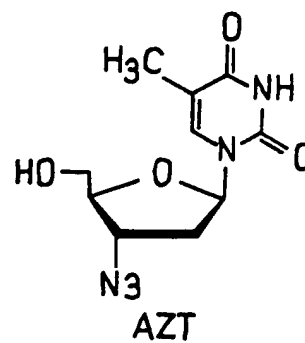
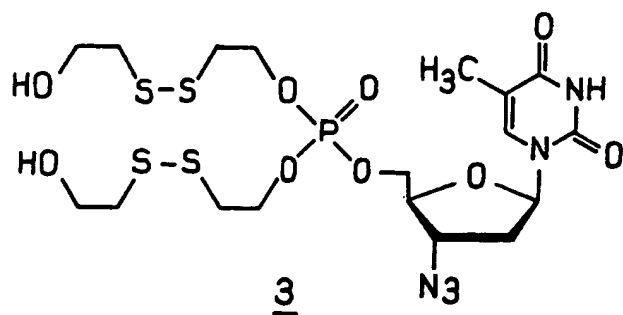
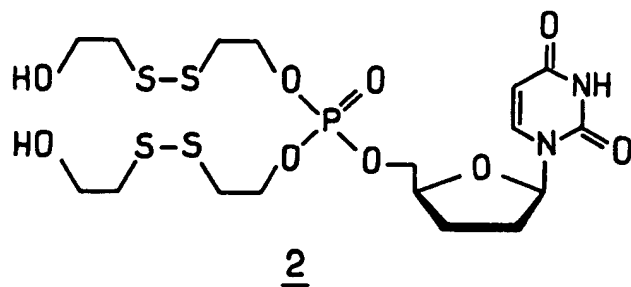
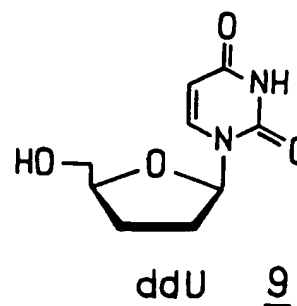
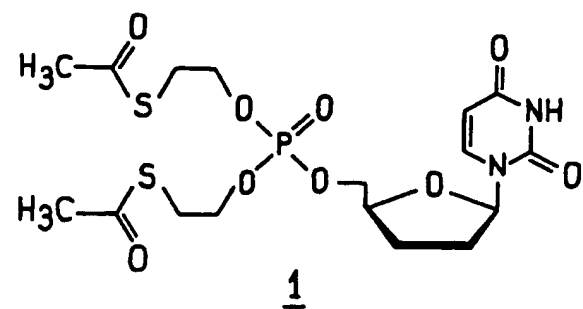
1 / 6

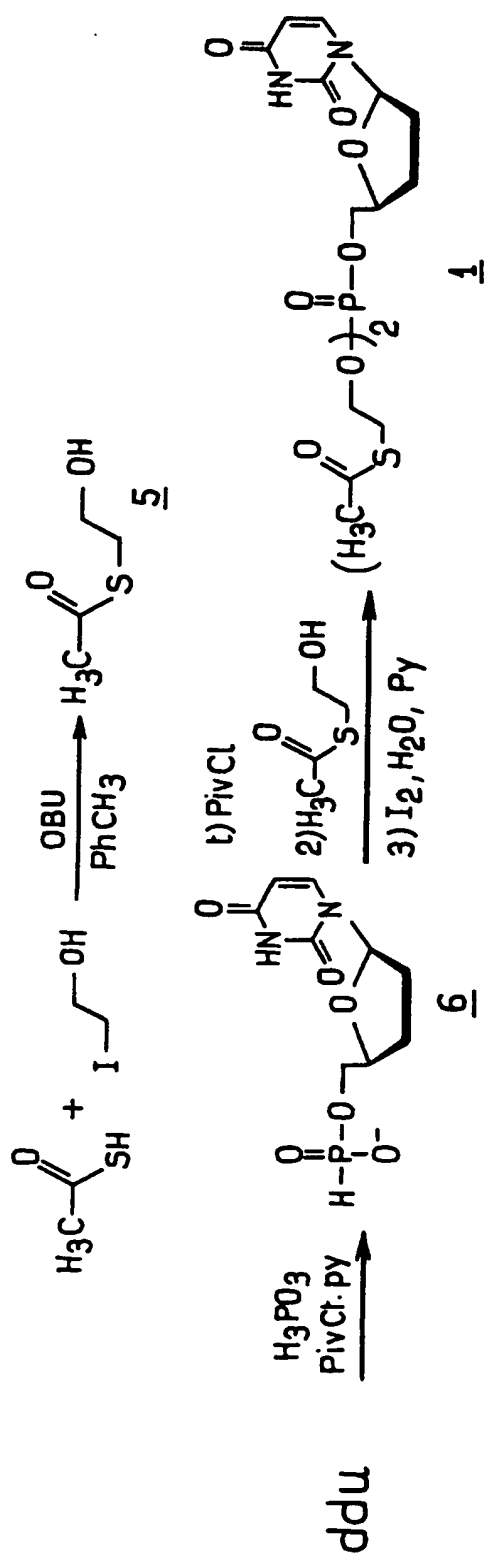
FIG. 1



**FIG. 2**

3 / 6

FIG. 3



## Schema 2

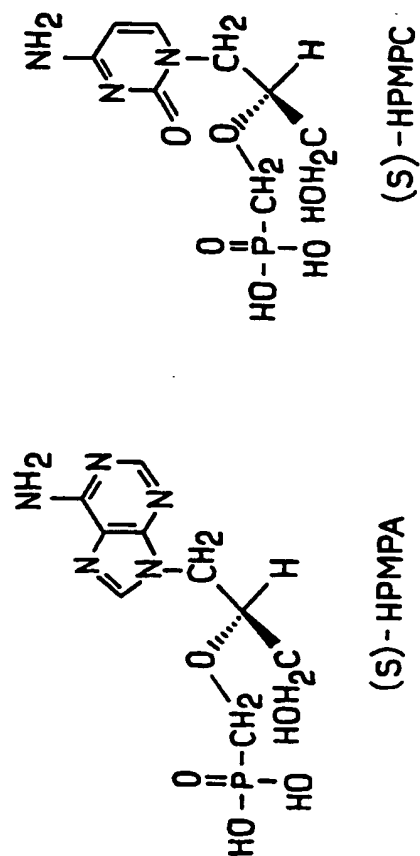
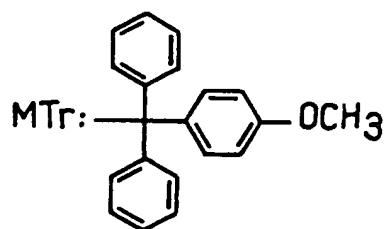
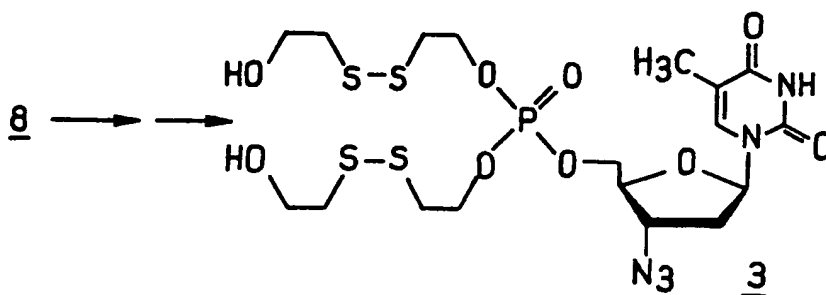
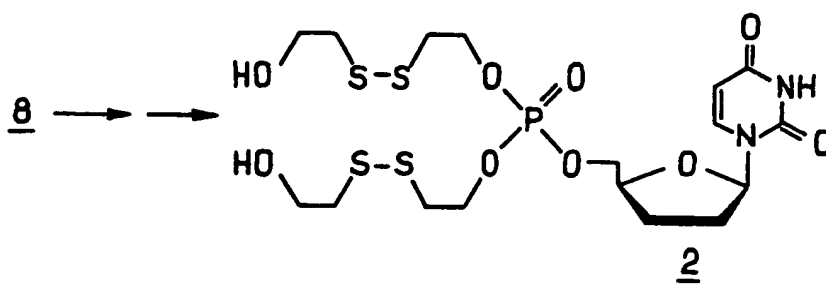
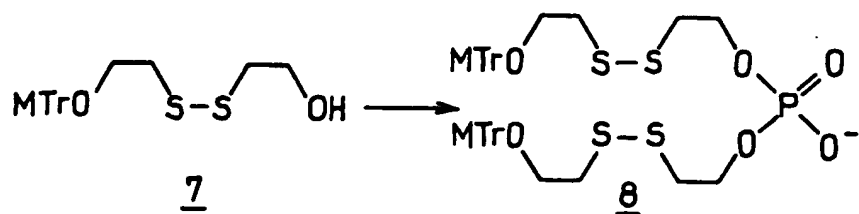
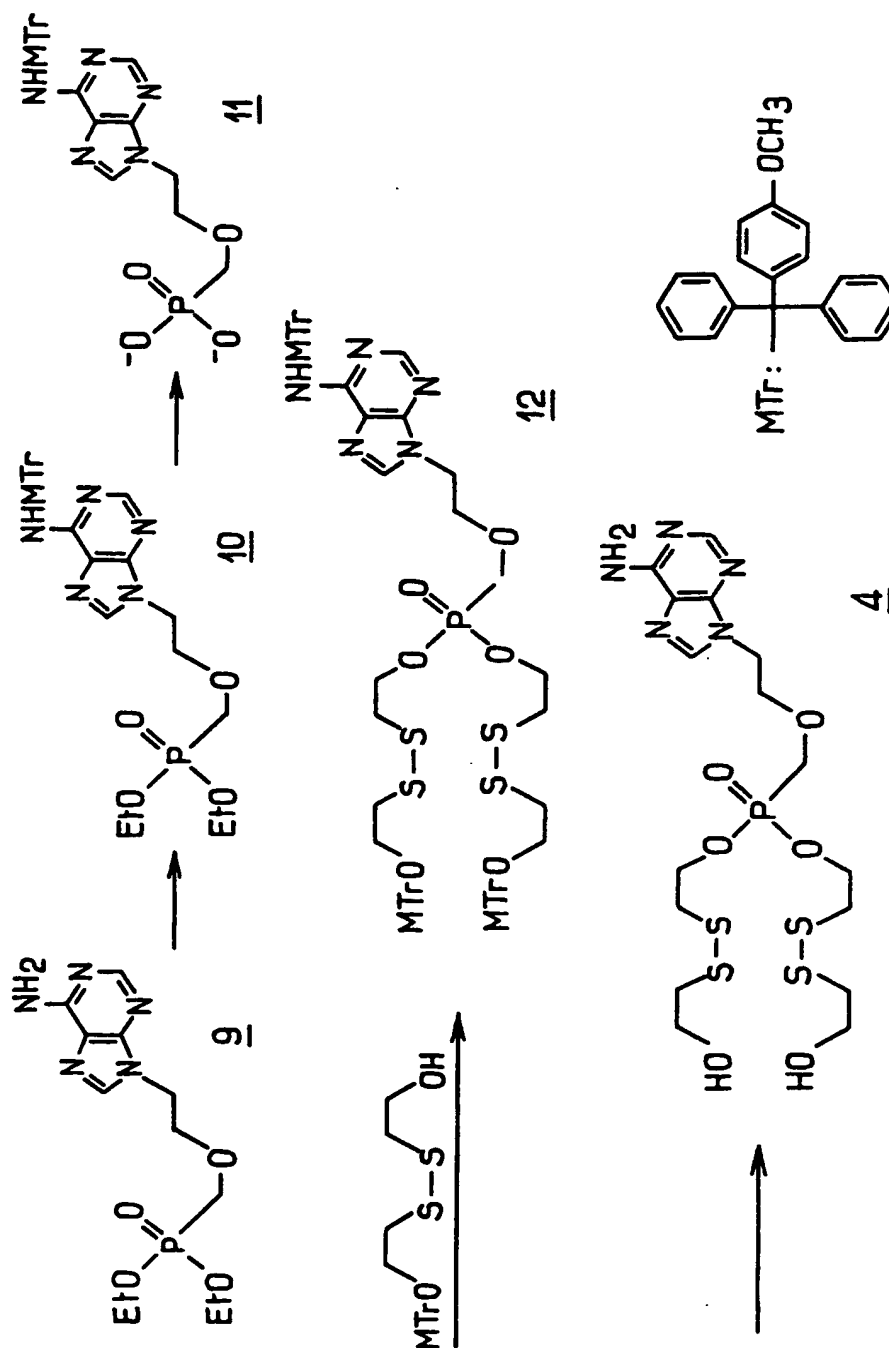


FIG. 4

5 / 6

FIG. 5

6 / 6

Schéma 3FIG-6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 93/00498

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl.<sup>5</sup> C07H19/10; C07H19/20; C07F9/6561; A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl.<sup>5</sup> C07H ; C07F ; A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                        | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| A         | FR,A,2 654 106 (SYNTHELABO)<br>10 May 1991<br>see abstract  | 1                     |
| A         | WO,A,9 114 696 (GILEAD SCIENCES, INC.)<br>3 October 1991<br>see the whole document                        | 1                     |
| A         | EP,A,0 481 214 (BRISTOL-MYERS SQUIBB<br>COMPANY)<br>22 April 1992<br>see page 1, line 1 - page 7, line 35 | 1                     |
| A         | EP,A,0 322 384 (MEDIVIR AKTIEBOLAG C/O<br>STATENS)<br>28 June 1989<br>see the whole document              | 1                     |
| ./.       |   |                       |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 August 1993 (02.08.93)

Date of mailing of the international search report

25 August 1993 (25.08.93)

Name and mailing address of the ISA:

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR 93/00498

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages           | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | EP, A, 0 217 580 (THE WELLCOME FOUNDATION LIMITED)<br>8 April 1987<br>see the whole document | 1                     |



**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

FR 9300498  
SA 74761

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

02/08/93

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)   | Publication<br>date  |
|---|---------------------|--|--|
| FR-A-2654106                              | 10-05-91            | None   |  |
| WO-A-9114696                              | 03-10-91            | AU-A- 7759291<br>CA-A- 2079109<br>EP-A- 0537299  | 21-10-91<br>30-09-91<br>21-04-93   |
| EP-A-0481214                              | 22-04-92            | CA-A- 2051239<br>JP-A- 4230694   | 15-03-92<br>19-08-92   |
| EP-A-0322384                              | 28-06-89            | AU-A- 2452288<br>JP-A- 1151595   | 04-05-89<br>14-06-89   |
| EP-A-0217580                              | 08-04-87            | AU-B- 595832<br>AU-A- 6270286<br>CA-A- 1302263<br>GB-A- 2181128<br>AT-B- 390000<br>AT-B- 392794<br>AU-B- 572019<br>CA-A- 1238277<br>DE-A- 3608606<br>DE-A- 3645058<br>DE-A- 3645059<br>DE-A- 3687069<br>EP-A,B 0196185<br>EP-A,B 0291633<br>EP-A- 0306597<br>JP-A- 63290895<br>JP-A- 62103100<br>US-A- 4847244<br>US-A- 4818750<br>US-A- 4857511<br>US-A- 5145840<br>US-A- 5086044 | 12-04-90<br>19-03-87<br>02-06-92<br>15-04-87<br>26-02-90<br>10-06-91<br>28-04-88<br>21-06-88<br>18-09-86<br>02-02-89<br>05-01-89<br>10-12-92<br>01-10-86<br>23-11-88<br>15-03-89<br>28-11-88<br>13-05-87<br>11-07-89<br>04-04-89<br>15-08-89<br>08-09-92<br>04-02-92 |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR 93/00498

|   |   |   |
|---|---|---|
| <b>I. CLASSEMENT DE L'INVENTION</b> (si plusieurs symboles de classification sont applicables, les indiquer tous) <sup>7</sup>  |   |   |
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB<br><div style="display: flex; justify-content: space-between; font-family: monospace;"> <span>CIB 5 C07H19/10;</span> <span>C07H19/20;</span> <span>C07F9/6561;</span> <span>A61K31/70</span> </div>  |   |   |
| <b>II. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b>   |   |   |
| Documentation minimale consultée <sup>8</sup>   |   |   |
| Système de classification   | Symboles de classification  |   |
| CIB 5   | C07H ;      C07F ;      A61K  |   |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où de tels documents font partie des domaines sur lesquels la recherche a porté  |   |   |
|   |   |   |
| <b>III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b> <sup>10</sup>   |   |   |
| Catégorie <sup>9</sup>  | Identification des documents cités, avec indication, si nécessaire, <sup>12</sup> des passages pertinents <sup>13</sup> | No. des revendications visées <sup>14</sup>   |
| A   | FR,A,2 654 106 (SYNTHELABO)<br>10 Mai 1991<br>voir abrégé<br>---  | 1   |
| A   | WO,A,9 114 696 (GILEAD SCIENCES, INC.)<br>3 Octobre 1991<br>voir le document en entier<br>---                           | 1   |
| A   | EP,A,0 481 214 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY)<br>22 Avril 1992<br>voir page 1, ligne 1 - page 7, ligne 35<br>---        | 1   |
| A   | EP,A,0 322 384 (MEDIVIR AKTIEBOLAG C/O STATENS)<br>28 Juin 1989<br>voir le document en entier<br>---                    | 1   |
| -/-   |   |   |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p><sup>9</sup> Catégories spéciales de documents cités:<sup>11</sup></p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" document ultérieur publié postérieurement à la date de dépôt international ou à la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier.</p> <p>"A" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div> |   |   |
| <b>IV. CERTIFICATION</b>  |   |   |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée<br><div style="text-align: center; font-family: monospace;">02 AOÛT 1993</div>  |   | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale<br><div style="text-align: center; font-family: monospace;">25. 08. 93</div> |
| Administration chargée de la recherche internationale<br><div style="text-align: center; font-family: monospace;">OFFICE EUROPEEN DES BREVETS</div>   |   | Signature du fonctionnaire autorisé<br><div style="text-align: center; font-family: monospace;">SCOTT J.R.</div>                              |

| III. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS <sup>14</sup> |   | (SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDiques SUR LA<br>DEUXIEME FEUILLE) |
|--|---|--|
| Catégorie *  | Identification des documents cités, <sup>16</sup> avec indication, si nécessaire<br>des passages pertinents <sup>17</sup> | No. des revendications<br>visées <sup>18</sup>                 |
| A  | EP,A,0 217 580 (THE WELLCOME FOUNDATION<br>LIMITED)<br>8 Avril 1987<br>voir le document en entier<br>-----                | 1  |

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE  
RELATIF A LA DEMANDE INTERNATIONALE NO.**

FR 9300498  
SA 74761

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche internationale visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

02/08/93

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s)  | Date de<br>publication   |
|---|------------------------|--|--|
| FR-A-2654106                                    | 10-05-91               | Aucun  |  |
| WO-A-9114696                                    | 03-10-91               | AU-A- 7759291<br>CA-A- 2079109<br>EP-A- 0537299  | 21-10-91<br>30-09-91<br>21-04-93   |
| EP-A-0481214                                    | 22-04-92               | CA-A- 2051239<br>JP-A- 4230694   | 15-03-92<br>19-08-92   |
| EP-A-0322384                                    | 28-06-89               | AU-A- 2452288<br>JP-A- 1151595   | 04-05-89<br>14-06-89   |
| EP-A-0217580                                    | 08-04-87               | AU-B- 595832<br>AU-A- 6270286<br>CA-A- 1302263<br>GB-A- 2181128<br>AT-B- 390000<br>AT-B- 392794<br>AU-B- 572019<br>CA-A- 1238277<br>DE-A- 3608606<br>DE-A- 3645058<br>DE-A- 3645059<br>DE-A- 3687069<br>EP-A, B 0196185<br>EP-A, B 0291633<br>EP-A- 0306597<br>JP-A- 63290895<br>JP-A- 62103100<br>US-A- 4847244<br>US-A- 4818750<br>US-A- 4857511<br>US-A- 5145840<br>US-A- 5086044 | 12-04-90<br>19-03-87<br>02-06-92<br>15-04-87<br>26-02-90<br>10-06-91<br>28-04-88<br>21-06-88<br>18-09-86<br>02-02-89<br>05-01-89<br>10-12-92<br>01-10-86<br>23-11-88<br>15-03-89<br>28-11-88<br>13-05-87<br>11-07-89<br>04-04-89<br>15-08-89<br>08-09-92<br>04-02-92 |

EPO FORM P0072

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82